

外源性 VEGF 及 Ang-1 对大鼠 CNV 的作用及机制探讨

卢秀珍, 毕宏生, 崔彦, 左振刚

基金项目: 中国山东省自然科学基金资助项目 (No. Y2006C101)
作者单位: (250002) 中国山东省济南市, 山东中医药大学第二附属医院 山东中医药大学眼科研究所
作者简介: 卢秀珍, 女, 博士研究生, 副主任医师, 研究方向: 弱视斜视小儿眼病的诊治。
通讯作者: 崔彦, 女, 硕士研究生导师, 副主任医师, 副教授, 研究方向: 玻璃体视网膜病诊断与手术、疑难病诊治及显微手术。 cuiyan2@medmail.com.cn
收稿日期: 2010-07-26 **修回日期:** 2010-08-27

Effect and mechanism of VEGF and Ang-1 on differentiation and maturation of choroidal neovascluarization

Xiu-Zhen Lu, Hong-Sheng Bi, Yan Cui, Zhen-Gang Zuo

Foundation item: Natural Science Foundation of Shandong Province, China (No. Y2006C101)
The 2nd Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Eye Institute of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250002, Shandong Province, China
Correspondence to: Yan Cui. The 2nd Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Eye Institute of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250002, Shandong Province, China. cuiyan2@medmail.com.cn
Received: 2010-07-26 Accepted: 2010-08-27

Abstract

• **AIM:** To explore the effect and mechanism of VEGF and Ang-1 on differentiation and maturation of choroidal neovascluarization.
• **METHODS:** Mice of CNV model were received intravitreal injection with VEGF or Ang-1, the FFA images and pathological section were analyzed to detect the effects of factor Ang-1 or VEGF.
• **RESULTS:** In CNV model mice Ang-1 group was found less later period leakage than the control group, while in VEGF group is more than the control group. The scar was found in pathological tissue section of Ang-1 group, and granulation tissue was found in VEGF and control group.
• **CONCLUSION:** Ang-1 can suppress the formation and maturation of CNV and improve the scar formation.
• **KEYWORDS:** vascular endothelial growth factor; angiopoietin-1; choroidal neovascluarization; differentiation/maturation; mechanism

Lu XZ, Bi HS, Cui Y, *et al.* Effect and mechanism of VEGF and Ang-1 on differentiation and maturation of choroidal neovascluarization. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010;10(10):1874-1877

摘要

目的: 研究细胞因子 VEGF, Ang-1 对大鼠脉络膜新生血管的形成、分化以及成熟过程的影响及机制。
方法: 采用激光光凝诱导建立大鼠 CNV 动物模型后, 分别在不同时期玻璃体腔注射 VEGF, Ang-1, 通过其眼底荧光造影与病理切片的变化观察上述因子的作用。
结果: 血管生成素-1 组比对照组晚期渗漏明显减少, VEGF 组较对照组晚期渗漏明显增加; 组织病理切片显示实验组瘢痕形成, VEGF 组和对照组可见肉芽组织。
结论: 血管生成素-1 能有效抑制脉络膜新生血管的生成, 促进新生的脉络膜新生血管成熟, 促进瘢痕形成。
关键词: 血管内皮生长因子; 促血管生成素-1; 脉络膜新生血管; 分化/成熟; 机制
DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2010.010.011

卢秀珍, 毕宏生, 崔彦, 等. 外源性 VEGF 及 Ang-1 对大鼠 CNV 的作用及机制探讨. 国际眼科杂志 2010;10(10):1874-1877

0 引言

脉络膜新生血管 (choroidal neovascluarization, CNV) 与许多常见眼底病有关, 常累及黄斑区, 常致视力的严重丧失。CNV 的产生过程很复杂, 目前其具体机制尚不明确, CNV 的分化、成熟又同样受多种细胞因子的影响, 其中最主要的因子为 VEGF, Ang-1, 我们通过动物实验给予激光光凝诱导建立的 CNV 模型大鼠在玻璃体腔内注射因子 VEGF 及 Ang-1 后观察其 CNV 形成的数量、血管荧光造影与视网膜病理切片的变化, 以期进一步探讨因子 VEGF 及 Ang-1 对 CNV 分化以及成熟过程的作用, 现将结果汇报如下。

1 材料和方法

1.1 材料 雌雄不限、体质量为 200~300g 的 Brown Norway (BN) 健康成年大鼠 50 只, 由维通利华提供, 为清洁级动物。所有动物均在实验前经裂隙灯显微镜检查和眼底检查, 排除屈光间质及眼底异常。主要试剂及仪器: VEGF 及 Ang-1 由美国 R&D 公司提供, 纯度 >95%; 半导体激光器 (德国 Carl Zeiss 公司生产); 裂隙灯间接眼底镜 (美国 Cular Instr. Imc 公司生产); 眼底荧光造影机 (德国 Heidelberg 公司生产)。

1.2 方法

1.2.1 CNV 动物模型的制作 按 5mg/kg 的剂量腹腔注射氯胺酮将大鼠麻醉, 双眼滴复方托吡卡胺滴眼液散瞳。麻醉后的大鼠置于半导体激光器前, 调整激光的波长为 810nm, 光斑直径 100 μ m, 曝光时间 0.1s, 通过裂隙灯间接检眼镜, 将瞄准光斑聚焦在视网膜上, 对视盘附近的视网膜进行激光光凝。光凝时避开大血管, 每眼光凝 10 次, 光凝过程中适当调整激光功率 (120 mW), 使激光光斑反应为 III 级, 以击穿 Bruch 膜、光斑呈浓白色泡状为度, 其中少数有视网膜前或视网膜下小片出血。将接受激光光凝后经检查有严重眼底出血和玻璃体积血不能观察清楚者剔除实验。

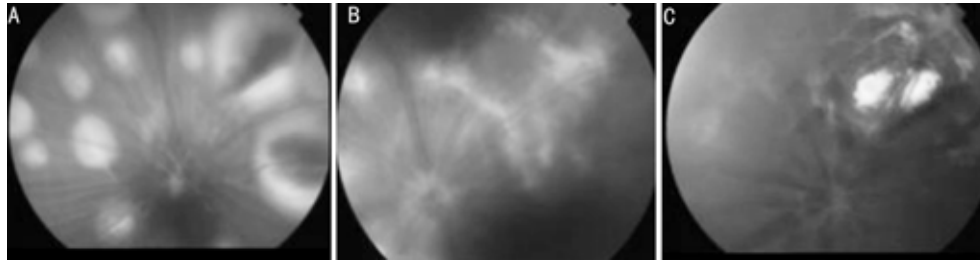


图1 光凝后鼠眼底彩照 A:0d;B:14d;C:28d。

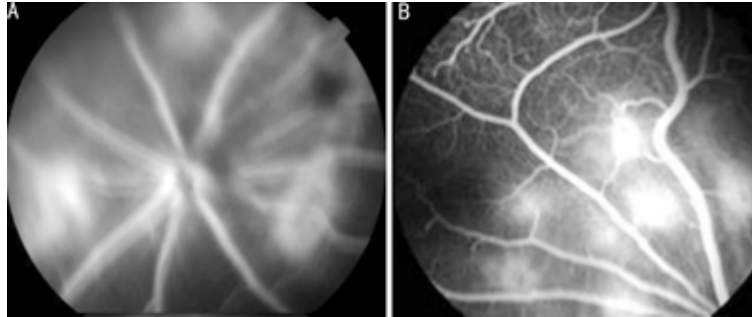


图2 光凝后荧光造影 A:14d;B:28d。

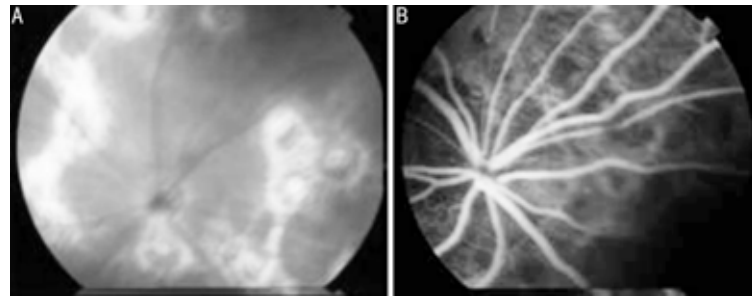


图3 Ang-1 组用药后 14d 眼底彩照及荧光造影 A:眼底彩照;B:荧光造影。

1.2.2 血管生成素-1 对 CNV 生成的抑制作用 取接受激光光凝后经检查无严重眼底出血和玻璃体出血的 20 只 BN 大鼠随机分为 2 组:实验组、对照组,每组各 10 只 20 眼。分别于光凝后第 0,1,2,3d,在实验组和对照组大鼠眼玻璃体腔内分别注射 0.05mL 浓度为 0.2 μ g/mL 血管生成素-1 药液 0.05mL 和平衡盐溶液 0.05mL。注药前先行前房穿刺抽出房水 0.05mL。注射中注意不损伤晶状体和视网膜,否则将此鼠眼筛出实验。在激光光凝后 14d 将大鼠麻醉散瞳后,按 0.5mg/kg 的剂量腹腔注射 100g/L 荧光素钠,行荧光素眼底血管造影(FFA),一直记录至注射后 30min。FFA 中代表 CNV 的荧光渗漏标准为:早期强荧光,后期持续性增强,伴或不伴有扩散的斑片状强荧光。

1.2.3 血管生成素-1 对已形成的 CNV 的作用 于激光光凝后 14d 行 FFA 检查,选取造影示有脉络膜新生血管 BN 大鼠 30 只,随机分为 3 组:血管生成素-1 组、血管内皮生长因子(VEGF)组、对照组,每组各 10 只 20 眼。分别于分组后第 0,1,2,3d,在血管生成素-1 组、血管内皮生长因子(VEGF)组和对照组大鼠眼玻璃体腔内分别注射浓度为 0.2 μ g/mL Ang-1 药液 0.05mL、浓度为 0.2 μ g/mL VEGF 0.05mL 和平衡盐溶液 0.05mL。注药前先行前房穿刺抽出 0.05mL 房水。注射中注意不能损伤晶状体和视网膜,否则将此鼠眼筛出实验。在注药后 14d,将大鼠麻醉散瞳后,按 0.5mg/kg 的剂量腹腔注射 100g/L 荧光素钠,行荧光素眼底血管造影(FFA),一直记录至注射后 30min。FFA 中代表 CNV 的荧光渗漏标准为:早期强荧光,后期持

续性增强,伴或不伴有扩散的斑片状强荧光。脉络膜新生血管组织病理切片制作:各组任取 5 只 BN 大鼠用过量的戊二醛处死后,迅速摘除眼球,浸入 25g/L 戊二醛固定液中固定 72h,每日更换固定液。3d 后处理眼球,将组织条块石蜡包埋、切片,HE 染色,光学显微镜下观察。

统计学分析:统计学分析使用 SPSS 13.0 软件对数据进行方差分析。数据用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,渗漏率和 b 波振幅比率均数之间的比较分别采用 *t* 检验和方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 激光诱导鼠 CNV 模型的建立 激光诱导鼠 CNV 模型的建立见图 1,2。激光光凝后 0d 彩照可见新鲜激光斑及网膜前出血。激光光凝后 14d 彩照可见视网膜前出血部分吸收,荧光素钠血管造影可见荧光渗漏。激光光凝后 28d:眼底照片见激光斑明显瘢痕化,仍有少量视网膜前出血。荧光素钠血管造影仍可见少量晚期荧光渗漏。

2.2 血管生成素-1 对激光诱导的鼠 CNV 形成的抑制作用

2.2.1 CNV 的发生 将实验中损伤晶状体或视网膜的 2 只鼠(实验组及对照组各 1 只)剔除实验。激光光凝后 14d,实验组 CNV 的发生率为(32.33 \pm 3.47)%,明显低于对照组的(65.53 \pm 3.53)% ($t=34.22, P=0.00$)。

2.2.2 CNV 的眼底血管造影结果 实验组(Ang-1)用药后 14d 眼底彩照可见激光斑形成,瘢痕形成,荧光造影可见无明显晚期渗漏(图 3)。对照组 14d 眼底彩照可见激光斑明显,瘢痕化,仍有少量网膜前出血。FFA 可见晚期渗漏明显(图 4)。

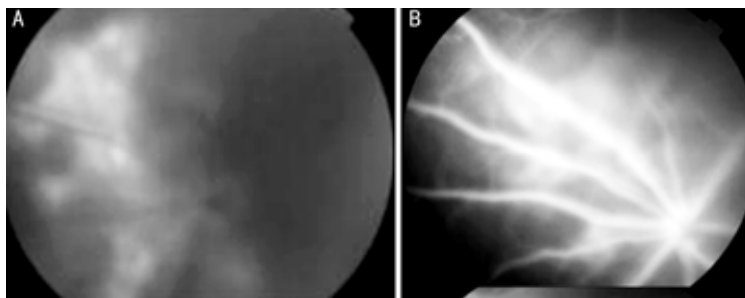


图4 对照组晚期眼底彩照及荧光造影 A:眼底彩照;B:荧光造影。

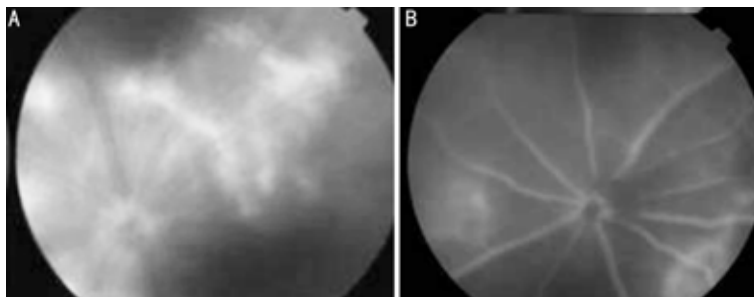


图5 对照组中晚期眼底彩照及荧光造影 A:眼底彩照; B:荧光造影。

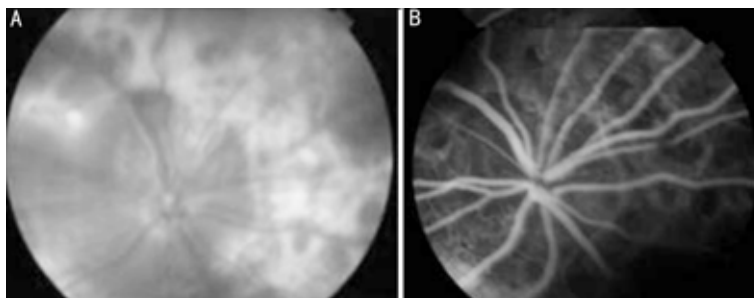


图6 Ang-1 组注射后 14d 眼底彩照及荧光造影 A:眼底彩照; B:荧光造影。

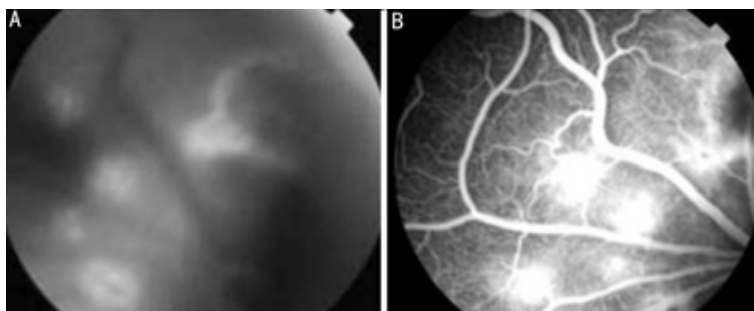


图7 VEGF 组注射后 14d 眼底彩照及荧光造影 A:眼底彩照; B:荧光造影。

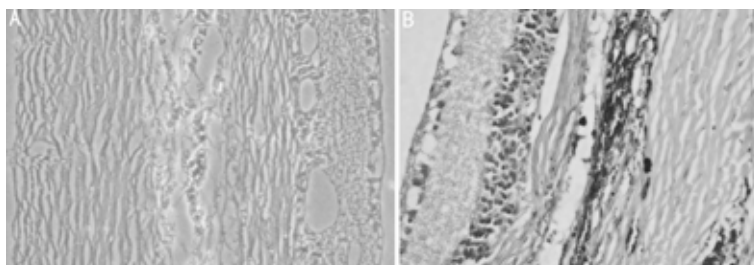


图8 组织病理切片照片 A:Ang-1 组; B:VEGF 组。

2.3 血管生成素-1 对已形成的 CNV 的作用

2.3.1 FFA 结果显示 血管生成素-1 组比对照组晚期渗漏明显减少,而 VEGF 组较对照组晚期渗漏明显增加。(1)空白对照组注射后 14d 眼底彩照可见激光斑形成,视网膜前少量出血,FFA 可见中晚期荧光渗漏(图 5)。(2) Ang-1 组注射后 14d 眼底彩照可见激光斑形成,瘢痕形

成,脉络膜视网膜有萎缩表现,FFA 可见中晚期渗漏明显减少(图 6)。(3)VEGF 组注射后 14d 眼底彩照可见激光斑,视网膜前较多出血,FFA 可见明显中晚期荧光渗漏(图 7)。

2.3.2 组织病理切片照片 组织病理切片照片见图 8。Ang-1 组仅见少量 CNV。VEGF 组可见大量 CNV。

3 讨论

许多致盲性眼病与病理性的 CNV 形成有关,因此防治 CNV 一直是学者们致力于攻克的难题。目前针对这类疾病在临床上主要的治疗方法是激光治疗和手术治疗,但是这两种方法多数情况下仅能控制病情的发展,而且有一定的副作用和局限性^[1,2]。因此,寻找新的有效治疗手段已成为眼科研究的热点。血管生成素-1(Ang-1)是一种特异性作用于血管内皮细胞的细胞因子,对胚胎期的血管生成和生后的血管稳定起重要作用^[3]。有学者^[4]发现激光诱导的 BN 大鼠 CNV 与人类 CNV 病变具有相似的细胞成分和病理过程。激光光凝 BN 鼠视网膜可诱导产生 60%~100% 的 CNV,行激光光凝后前 3d 和第 14d 分别是炎症反应和 CNV 形成的高峰,此后变化不大,6mo 时 CNV 萎缩^[5,6]。故我们采此种模型,参照以往资料和预实验结果来确定玻璃体内给药方式和剂量,以提高眼局部药物浓度及减少全身用药的副作用,选择给药时间是激光光凝后第 0~3d,评估 CNV 的时间为第 14d,并确定 Ang-1 抑制 CNV 效果的确性和安全性。

3.1 血管生成素-1 对激光诱导的鼠 CNV 的抑制作用 本研究中 FFA 结果显示,激光光凝后 14d 时,治疗组 CNV 发生率明显低于对照组,表明 Ang-1 能有效抑制激光诱导的 CNV 形成。有研究表明 Ang-1 抑制内皮凋亡的作用,能增强细胞间的连接、稳定血管壁的完整,稳定血管及降低血管通透性,从而有稳定血管、防止渗漏的作用^[7],另有研究^[8]表明 Ang-1 可以抑制视网膜屏障的破坏,从而减少血管的渗漏和出血。Ang-1 可以保护血管内皮细胞免受白细胞介导的内皮细胞损伤。Ang-1 可以降低 VEGF 和 ICAM-1 的 mRNA 和蛋白水平。胚胎时期如果阻断 Tie-2 受体虽然胚胎中仍有血管内皮细胞的形成,但生成的血管属于幼稚血管,结构和功能都不完善;如果阻断 Ang-1 和受体的结合可以发现新生血管内皮细胞和周围间质细胞的缺乏紧密连接,血管分枝不足且不能形成完整的管状结构。缺乏 Ang-1 基因表达的小鼠其胚胎血管发育异常,血管网生成简单血管重塑缺陷,管径无明显区别,小鼠内皮细胞外的血管周细胞缺如,胶原纤维样细胞分散,纤维丝短缩,而后者是维持血管稳定的关键因素。9.5d 就出现心脏发育缺陷,心室内仅有内皮细胞衬而缺少心肌小梁,12.5d 出现胚胎死亡;进一步研究发现血管内皮细胞不能与其支撑细胞相互作用而无法维持血管结构^[9]。过度表达 Ang-1 的转基因小鼠,其血管生成增多,但最明显的是管腔增大,血管基底膜连接更为完整,这提示 Ang-1 可能增加血管管径而不增加萌出分支。

3.2 血管生成素-1 对已形成的 CNV 的作用 VEGF 促进血管渗透性,促进新生血管形成,而 Ang-1 的主要功能是

保证新生血管内皮细胞的正确组装、促进内皮周围支持细胞的聚集和血管重塑,从而维持新生血管的完整性和稳定性,有效防止炎症及血管通透性增加。本研究中 FFA 结果显示血管生成素-1 组比对照组晚期渗漏明显减少;VEGF 组则较对照组晚期渗漏明显增加。组织病理切片显示实验组少量 CNV 并有瘢痕形成,VEGF 组和对照组则可见大量 CNV 及肉芽组织。此结果支持以往的关于这两种因子功能的结论。同时,Ang-1 也是内皮生存因子,可以抑制在体血管的血浆渗漏和下调体内皮细胞渗透性,从而保护血管^[10]。VEGF 触发血管新生的发生,失去正常微环境的内皮非常容易浸润、迁移,形成新生血管,但新生的血管结构不完整,需要 Ang-1 去加固、稳定,才能形成正常的血管形态。所以 VEGF 主要在血管新生的早期起作用,Ang-1 在血管新生中、后阶段发挥抑制作用。

血管生成素 1 可有效抑制实验性脉络膜新生血管的生成,血管生成素 1 能促进实验性新生的脉络膜新生血管分化成熟,并促进瘢痕形成。

参考文献

- 1 Campochiaro PA, the First ARVO/Pfizer Institute Working Group. Ocular versus Extraocular Neovascularization: mirror images or vague resemblances. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(2):462-474
- 2 Lam DS, Chan CK. Intravitreal triamcinolone plus sequential grid laser versus triamcinolone or laser alone for treating diabetic macular edema: six-month outcomes. *Ophthalmology* 2007;114(12):2162-2167
- 3 Lambouij AC. Insulin-like growth factor-1 and its receptor in neovascular age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(5):2192-2198
- 4 Grant MB, Afzal A. The role of growth factors in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Exp Opin Invest Drugs* 2004;13(10):1275-1293
- 5 Kuroki AM, Bhutto IA, Kitaoka T. Natural course of experimental choroidal neovascularization; three dimensional study with corrosion cast and scanning electron microscope. *Ophthalmic Res* 2002;34(4):200-205
- 6 王洵,唐罗中,唐朝珍,等. 半导体激光诱导大鼠脉络膜新生血管模型的建立. *中国现代医学杂志* 2005;15(9):1326-1329
- 7 Benest AV, Salmon AH. VEGF and angiopoietin-I stimulate different angiogenic phenotypes that combine to enhance functional neovascularization in adult tissue. *Microcirculation* 2006;13(6):423-437
- 8 Gamble JR, Drew J. Angiopoietin-I is an antipermeability and anti-inflammatory agent *in vitro* and targets cell junctions. *Circ Res* 2000;87(7):603-607
- 9 Papapetropoulos A, Fulton D, Mahboubi K, et al. Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/survivin pathway. *Biol Chem* 2000;275(13):9102-9105
- 10 Pizurki L, Zhou ZG, Glynos K. Angiopoietin-1 inhibits endothelial permeability neutrophil adherence and IL-8 production. *Br J Pharmacol* 2003;139(2):329-336